

EMULSION STABILIZER AND EMULSIFIED MATERIAL

Patent number: JP2003284937
Publication date: 2003-10-07
Inventor: ISHIKAWA AIKO; HONDA MICHINARI; SATO MIKA;
KOMURA KEIGO
Applicant: IKEDA SHOKKEN KK
Classification:
- international: B01F17/30; A23L1/035; A61K9/107; A61K47/42;
B01J13/00; A23L1/20
- european:
Application number: JP20020090039 20020327
Priority number(s): JP20020090039 20020327

Report a data error here

Abstract of JP2003284937

<P>PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain an emulsion stabilizer containing an anti-freeze protein, and an emulsified material using the same. <P>SOLUTION: Use of the anti-freeze protein improves the stabilization effect on the emulsified material, and prevents the emulsified material, for example, food, cosmetics, reagents, and medicines, whose emulsification is destroyed by conventional emulsion stabilizers and stabilization methods, from causing deterioration in quality of external appearance and function due to separation, thereby product value can be highly improved. The emulsified material using the anti-freeze protein can stabilize emulsification not only under a normal or chilled condition but also under a condition repeating freezing and thawing to provide a product having the same quality as that just after production. <P>COPYRIGHT: (C)2004,JPO

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

PL-908 7/9

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-284937

(P 2 0 0 3 - 2 8 4 9 3 7 A)

(43) 公開日 平成15年10月7日 (2003.10.7)

| (51) Int. Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テ-マ-ト' (参考) |
|-----------------------------------|------|------------|-------------|
| B01F 17/30 | | B01F 17/30 | 4B020 |
| A23L 1/035 | | A23L 1/035 | 4B035 |
| A61K 9/107 | | A61K 9/107 | 4C076 |
| 47/42 | | 47/42 | 4D077 |
| B01J 13/00 | | B01J 13/00 | Z 4C065 |
| 審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全5頁) 最終頁に続く | | | |

| | | | |
|-----------|-----------------------------|----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願2002-90039 (P 2002-90039) | (71) 出願人 | 000210067 池田食研株式会社 広島県福山市箕沖町95番地 7 |
| (22) 出願日 | 平成14年 3 月27日 (2002. 3. 27) | (72) 発明者 | 石川 愛子 広島県福山市箕沖町95番地 7 池田食研株式会社内 |
| | | (72) 発明者 | 本田 通済 広島県福山市箕沖町95番地 7 池田食研株式会社内 |
| | | (72) 発明者 | 佐藤 美加 広島県福山市箕沖町95番地 7 池田食研株式会社内 |
| | | 最終頁に続く | |

(54) 【発明の名称】 乳化安定剤及び乳化物

(57) 【要約】

【解決手段】 不凍蛋白質を含有する乳化安定化剤およびそれを使用した乳化物を提供する。

【効果】 不凍活性蛋白を使用することで乳化物の安定化効果が向上し、従来の乳化安定化剤や安定化方法では、乳化が破壊されて価値を失っていた乳化物、例えば食品や化粧品、試薬、医薬品の分離による外観上、機能上の品質の劣化を防止し、製品価値を著しく向上させることが可能となる。さらに、本発明の不凍蛋白質を使用した乳化物は、常温、冷蔵条件下だけでなく、冷凍および解凍を繰り返すような条件下においても、乳化を安定化し、製造直後と同等の品質の製品が提供可能である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】不凍蛋白質を含有することを特徴とする乳化安定剤。

【請求項2】請求項1記載の乳化安定剤を含有することを特徴とする乳化物。

【請求項3】請求項1記載の乳化安定剤を含有する乳化物が食品、医薬品または化粧品であることを特徴とする請求項2記載の乳化物。

【請求項4】請求項1記載の乳化安定剤を含有する乳化物が、100 μ m以下の平均サイズの水不溶性ならびに／あるいは疎水性物質を含有してなるO/W型の乳化物、または100 μ m以下の平均サイズの水溶性ならびに／あるいは親水性物質を含有してなるW/O型の乳化物であるところを特徴とする請求項2～3のいずれか1項記載の乳化物。

【請求項5】不凍蛋白質を使用することを特徴とする乳化安定化方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、不凍蛋白質を含有する新規な乳化安定剤、およびそれを含有する乳化物に関する。さらに、本発明は不凍蛋白質を使用することにより乳化を安定化し、取り扱いの簡便さ、または長期保存性を付与する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】乳化は、互いに溶け合わない二種類以上の成分の一方が他方へ細粒状に分散した状態にある。各々の成分の特徴を合わせて具備する乳化物は、食品、医薬品や化粧品など様々な分野で利用されているが、分散相間の不可逆的な凝集あるいは合一が起り、乳化が解除されて再び二種類以上の成分に分離することが問題となっている。これを防止するために、乳化剤としての界面活性剤が頻繁に利用されている。界面活性剤は、その分子内に親油性部分と親水性部分の両方をもつため、水に溶けるとその溶液の表面張力を著しく減少させる性質があり、水に溶解させたときイオンに解離するイオン性界面活性剤と、イオン化しない非イオン性界面活性剤とに大別され、イオン性界面活性剤は、さらに陰イオン性（アニオン性）界面活性剤、陽イオン性（カチオン性）界面活性剤、両性界面活性剤とに分けられる。食品に利用される乳化剤としては、グリセリン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、プロピレングリコール脂肪酸エステル、大豆レシチンなどが知られており、特許としてもいくつかが開示されている（特開昭61-15841号、特開昭63-044840号）。また、界面活性剤の代わりに親水コロイドを含ませる方法（特許3176934号）も知られているが、これらの方法によっても、特に冷解凍や加熱、振動といった様々な物理的要因によって急速に乳化が解除される場合があり、乳化をより安定化する方法が待望され

てきた。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上述の従来技術における問題点に鑑みて検討されたもので、乳化を安定化させることにより、乳化物の外観、構造、風味を含めた製品価値、機能性を著しく向上させることを可能とする手段を提供するものである。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、解決困難な上記問題を解決すべく、極めて有効でかつ効果的な方法を提供するため鋭意研究を行った結果、不凍蛋白質に顕著な乳化安定化効果を見出したので本発明を完成するものである。これにより、食品分野、医薬品分野、化粧品分野を含めた様々な分野において利用される乳化物の安定化が効率よく達成される。本発明は、不凍蛋白質を有効成分として含有する乳化安定剤を使用することで、乳化物中の成分変性や油水分離を含む分離を防止することにより、品質が良好で、かつ新規な乳化物である食品や医薬品、化粧品が提供可能であることを見出した。この乳化物は、不凍蛋白質を有効成分として含有することに特徴を有し、安定した乳化状態を維持することが可能であるため、本発明は上記の分野に大きく資する手段を提供するものである。

【0005】本発明は、少なくとも不凍蛋白質を含有する乳化安定剤に関し、本発明の乳化安定剤を含有する乳化物に関する。また、本発明の乳化物は、例えば、食品、医薬品、化粧品であり、詳細には、本発明の乳化物は、不凍蛋白質を含有してなる該乳化物が100 μ m以下の平均サイズの水不溶性ならびに／あるいは疎水性物質を含有してなるO/W型の乳化物か、または100 μ m以下の平均サイズの水溶性ならびに／あるいは親水性物質を含有してなるW/O型の乳化物である。

【0006】さらに、本発明は、不凍蛋白質を使用することによる乳化安定化方法に関する。本発明の乳化安定剤については、不凍蛋白質単独であっても、その他の乳化剤、調味料、香料、保存料などを含有していても良い。さらに本発明は、不凍蛋白質を含有する乳化安定剤を使用して得られた乳化物に関し、該乳化物の食品分野、医薬品分野、化粧品分野などへの応用も提供している。

【0007】本発明の不凍蛋白質は、冷海水中で生息している魚などに種々存在していることが知られており、相対分子量(Mr)が約3,300~140,000の不凍ポリペプチド(AFP)であり、Mrが約2,500~34,000の範囲の糖蛋白質(不凍糖蛋白質またはAFGP)をも含有する。Ananthanarayananら(Life Chemistry Reports 7:1-32 (1989))、DeVriesら(Ann. Rev. Physiol. 45:245-260 (1983))、Daviesら(FASEB j. 4:2460-2468)、Warrenら(米国特許第5,118,792号)、Griffithら(Plant Physiology 119: 1361-1369 (1999))により不凍蛋白質

が述べられている。現在、数種類の異なる不凍蛋白質が様々な冷水魚から確認されている。例えば、AFP (I型) はアラニンに富み (α ヘリックスポリペプチド)、カレイやカジカに存在している。AFP (II型) はハーフシスチンに富み、ケムシカジカ、ニシンやキュウリウオ科のワカサギなどにも存在している。AFP (III型) は球状の蛋白質がゲンゲやオオカミウオを含む数種のゾアルコイド科に存在している。1997年には、カジカからIV型のAFPも発見されている。南極魚と南北両極タラに見られる不凍糖蛋白質は、主に、トレオニル残基に結合した二糖を含むトリペプチド反復(Ala-Ala-Thr)からなっている。AFPとAFGPは構造上異なるが、氷表面に結合することにより氷晶成長を阻止する能力が共通している。現在AFPとAFGPは各種単離されており、そのDNA配列が決定されているものもある。本発明の不凍蛋白質は、AFP、AFGPを含有する抽出物であっても、それぞれに単離精製されたもの単独、もしくはそれらの混合物であってもよい。本発明の不凍蛋白質は、少なくとも植物由来、魚由来、昆虫由来、微生物由来を使用し、1種単独もしくはそれらを組合せて使用しても良く、遺伝子組み換え生物により生産された不凍蛋白質であってもよい。不凍蛋白質の製造方法は、生物から抽出、精製する通常の方法に順じて行えばよい。

【0008】本発明の乳化安定剤は、少なくとも上記の不凍蛋白質を含有し、不凍蛋白質単独の意味も有する。該乳化安定剤は、不凍蛋白質を有効成分とした解乳化の発生を防止する効果を有する。本発明の乳化安定剤は、該不凍蛋白質を溶液または粉末形態として製剤化することができ、あるいは添加対象とする製品の性状や工程等に合せて、顆粒状やペースト状の最も効果が期待できる剤形に加工することができる。また、本発明の乳化安定剤は、前記の不凍蛋白質と他の成分との混合形態であってもよい。そのような成分としては、不凍蛋白質の効果を損なわないものであって、かつ乳化物の加工やその機能等に好ましい効果を有するものを使用することができる。さらに、本発明の不凍蛋白質を含有してなる乳化安定剤は、該不凍蛋白質は下記の添加量から濃度を算出し使用すればよい。副成分として活性型のプロテアーゼが存在する場合にはプロテアーゼ活性阻害物質を含有することが好ましい。プロテアーゼ活性を有する物質を含有する乳化物に使用する場合、該プロテアーゼの作用しないpHなどの条件で、不凍蛋白質を内在させ使用してもよい。本発明の乳化物における不凍蛋白質の添加量は、適用する乳化物の種類、性質、形態など、あるいはこの不凍蛋白質を含有する乳化安定剤の成分組成に応じて適宜の範囲とすることができる。一般的に、乳化安定剤の乳化物への添加料は、乳化物に100重量%に対し80重量%以下、好ましくは0.01~50重量%とすることができる。また、乳化安定剤の有効成分であ

る不凍蛋白質の添加量は、乳化物100重量%に対し10重量%以下、好ましくは0.00001~1重量%であり、より望ましくは0.0001~0.1重量%である。例えば、1Lの豆乳の乳化を安定化させる場合には、0.1gの不凍蛋白質を含有させることができる。本発明の不凍蛋白質を含有する乳化安定剤は、少なくとも不凍蛋白質を含有し、その他に乳化剤、調味料、香料、保存料などを含有しても良い。

【0009】さらに本発明は、不凍蛋白質を含有する乳化安定剤を使用して得られた乳化物に関し、該乳化物の食品分野、医薬品分野、化粧品分野などへの応用も提供している。本発明の乳化物は不凍蛋白質を含有する乳化物であり、その種類などは制限されないが、少なくとも油脂および水を含有し、乳化しようとする乳化物を意味する。例えば、チョコレート、キャンディーなどの菓子類、カロチノイド、クロロフィルなどの色素類、バター、マーガリン、クリーム、卵などの乳油類、食用油、みそ、ソース、マヨネーズ、ドレッシング、甘味料などの調味料類、カレー、シチュー、スープなどの調味食品類、牛乳、豆乳、野菜飲料、アルコール飲料などの飲料類、ヨーグルト、アイスクリーム、プリンなどのデザート類などを挙げることができるが、これらに限定されない。加えて、通常化粧品や医薬品に使用される鉱物油、植物油、脂肪酸などを含有する乳化物にも有用であり、これらの食品、医薬品、化粧品は、望ましくは20重量%以上の水を含有し100 μ m以下のサイズの水不溶性ならびに／あるいは疎水性物質を含有してなるO/W型乳化物であるか、または20重量%以下の水を含有し100 μ m以下のサイズの水溶性ならびに／あるいは親水性物質を含有してなるW/O型乳化物であれば、特に有効である。なお本発明では、上記の乳化物には、甘味料、酸味料、香料、保存料、色素、保湿剤、界面活性剤、防腐・殺菌剤、酸化防止剤などの成分を必要に応じて適宜添加することができる。

【0010】本発明の乳化安定化方法は、少なくとも不凍蛋白質を使用した乳化物の乳化安定化の方法に関し、さらには、不凍蛋白質を含有する乳化安定剤を使用した乳化安定化方法に関する。本発明の乳化安定化方法については、乳化を安定化しようとする組成物に、不凍蛋白質を含有する乳化安定剤を含ませてから乳化させればよく、例えば、乳化前の単一の相に混入してから使用してもよい。好ましくは、適当な界面活性剤を使用して乳化させた後の乳化物に不凍蛋白質を含有する乳化安定剤を含ませることにより、さらに安定化効果は効率的に上昇し、乳化安定性の高い液体乳化物が得られる。すなわち、本発明による乳化物の乳化安定化方法は、少なくとも不凍蛋白質を含有する乳化安定剤を乳化物に含ませることにより構成される。本発明の乳化安定化方法は、乳化物の種類や乳化条件によって、さらに、乳化物の含有する水などの水溶性ならびに／あるいは親水性物質の含

有量、油などの水不溶性ならびに／あるいは疎水性物質の含有量、乳化サイズなどに応じて、乳化安定剤の添加時期など適宜変更すれば良い。前もって、不凍蛋白質を含む乳化物に、不凍蛋白質を含まない乳化剤を含有させても良い。好ましくは、乳化する乳化物をあらかじめ適当な乳化剤で乳化させてから、不凍蛋白質を含有する乳化安定剤を含ませると相乗的に乳化が安定化されるためより望ましい。これは必要最少量の不凍蛋白質を与える点でも好ましい。

【0011】本発明により安定化された乳化物は、常温の液体状態のまま、冷凍されたまま、あるいは冷解凍してから利用することができる。また、得られた乳化物は、加熱、剪断、凍結乾燥など通常行われる方法によって加工した原料素材としても利用可能である。

【0012】

【実施例】以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、本発明は、以下の実施例によって限定されるものではない。

【0013】

表1 評価結果

| | 目視 | 粒径 (μm) | 色素分離までの冷凍回数 |
|-------|-------------|-------------------------------------|-------------|
| ブランク | 油滴である色素が浮遊。 | 1 以上 (10 μm 以上が多く不均一) | 1回 |
| 不凍蛋白質 | 均一な色の液体 | 1~5 (均一) | 6回以上 |
| BSA | 不均一な色素粒子の液体 | 1~10 (1 μm が多く不均一) | 4回 |

その結果、AFPを添加した試料は、ブランクや対照品に比べて冷解凍による色素成分の分離が無く、良好な乳化状態を保っていた。

【0016】

【実施例2】10mgの不凍蛋白質 (Canada A F Protein Inc. 社製; Type I) を100mlの豆乳 (名古屋製酪株式会社製; 豆腐の出来る豆乳) に溶解した。50ml容量の蓋付き試験管に30ml充填し、-20℃の業務用冷凍冷蔵庫 (三洋電機株式会社製 SRR-MV1883C4) 中に20時間静置し、凍結品を得た。ブランクとしては不凍蛋白質 (AFP) を含まない試料、対照としては不凍蛋白質の代わりに10mgのBSA (和光純薬工業株式会社製)、および10mgのゼラチン (株式会社ダイエー製; ゼラチンパウダー) を混合した試料を作成した。凍結品を25℃下で自然解凍後に評価を行った。

【0017】 (冷解凍後の乳化安定性の評価) 評価は、不凍蛋白質添加試料、BSA添加試料、ゼラチン添加試料および未添加試料を1000rpmで3分間遠心分離して得られた澱を観察することにより行った。その結果、BSA添加試料、ゼラチン添加試料、未添加試料には解凍時に大きな塊状の澱が目視で確認され、遠心後約

【実施例1】10mgの不凍蛋白質 (Canada A F Protein Inc. 社製; Type I) と0.1gのトウガラシ色素の乳化製剤 (池田糖化工業株式会社製; 市販品) を100mlの蒸留水に溶かした。50ml容量の蓋付き試験管に30mlを充填し、-20℃の業務用冷凍冷蔵庫 (三洋電機株式会社製 SRR-MV1883C4) 中に20時間静置し、凍結品を得た。ブランクとしては不凍蛋白質を含まない試料、対照としては不凍蛋白質の代わりに10mgのBSA (和光純薬工業株式会社製) を添加した試料を作成した。凍結品を25℃下で自然解凍後、-20℃での冷凍および自然解凍を繰り返し、評価を行った。

【0014】 (冷解凍後の乳化安定性の評価) 評価は、5回冷解凍後の目視による全体観察、および液面から5mm部分の油滴の大きさを光学顕微鏡 (400倍) で測定することにより行った。また目視により色素の分離が見られるまでに要した冷解凍回数を測定した。

【0015】

【表1】

12mlの澱混濁液が回収された。一方、不凍蛋白質添加試料には澱が無く、ブランクや対照品に比べて冷解凍によって引き起こされた解乳化による澱成分の分離が無く、良好な乳化状態を保っており、ほぼ冷凍前の豆乳に復元した。以上の結果より、本発明が乳化物の乳化状態を極めて安定化し、その外観、味質を含む品質を向上するのに効果的であることが分かる。

【0018】

【発明の効果】本発明の不凍活性蛋白質を使用した乳化物の安定化方法により、従来の乳化安定化方法では乳化が破壊されて価値を失っていた乳化物、例えば食品や化粧品、試薬、医薬品の機能成分の分離、沈殿による外観上、機能上の品質の劣化を防止し、製品価値を著しく向上させることが可能となる。本発明の実施例において、冷凍および解凍を繰り返し行ったのは、常温での解乳化の発生を、加速度的に行うための試験である。これらのことから、本発明の不凍蛋白質を使用する乳化物の安定化方法により得られた乳化物は、常温保存、加温保存、冷蔵保存および／または冷凍保存しても製品価値を損なわない食品、化粧品、試薬、医薬品への利用が可能であり、繰り返し行った冷凍時においても解乳化の発生、機能成分の分離や不活化を防止する効果を奏する。よっ

て、本発明の不凍蛋白質を使用した乳化物は、常温や、
冷蔵条件下だけでなく、冷凍および解凍を繰り返すよう

な条件下においても、乳化を安定化し、製造直後と同等
の品質の製品が提供可能である。

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁷

識別記号

F I

ターコード' (参考)

// A 2 3 L 1/20

A 2 3 L 1/20

Z

(72) 発明者 小村 啓悟

広島県福山市箕沖町95番地7 池田食研株
式会社内

Fターム(参考)

4B020 LB18 LC07 LK07 LQ06

4B035 LC05 LE03 LG15 LK13

4C076 AA17 EE41Q FF16 FF43

4D077 AA02 AA04 AA09 AB08 AB11

AB12 AC03 AC10 BA01 BA11

DD62Z

4G065 AA01 AB19X AB35X BA13

CA03 CA04 DA01 DA02 EA03

PC-90288/9

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-250506

(P 2 0 0 3 - 2 5 0 5 0 6 A)

(43) 公開日 平成15年9月9日 (2003.9.9)

| (51) Int. Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テマコード (参考) |
|----------------------------|------|------------------|------------|
| A23L 3/42 | | A23L 3/42 | 3L113 |
| 3/44 | | 3/44 | 4B022 |
| A61K 9/19 | | A61K 9/19 | 4C076 |
| 47/42 | | 47/42 | |
| F26B 5/06 | | F26B 5/06 | |
| | | 審査請求 未請求 請求項の数 8 | OL (全6頁) |

(21) 出願番号 特願2002-57939 (P 2002-57939)

(22) 出願日 平成14年3月4日 (2002.3.4)

(71) 出願人 000210067

池田食研株式会社

広島県福山市箕沖町95番地7

(72) 発明者 小幡 斉

兵庫県尼崎市武庫之荘6丁目3番5号

(72) 発明者 河原 秀久

大阪府枚方市長尾元町7丁目11番34号

(72) 発明者 小村 啓悟

広島県福山市箕沖町95番地7 池田食研株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 凍結乾燥方法

(57) 【要約】

【解決手段】 不凍蛋白質を含有してなる物質の凍結乾燥方法、および得られた凍結乾燥物を提供する。

【効果】 本発明において不凍活性蛋白を使用することで、凍結乾燥処理により得られる凍結乾燥物は、凍結乾燥後の色調、風味、栄養分あるいは生理活性成分などが保持されたままであり、かつ乾燥による嵩の減少防止がなされ、さらには品質の劣化や、形状の崩壊や吸湿などの防止が図れる。すなわち、本発明の不凍蛋白質活性を内在させる被乾燥物は、食品、植物、薬品、蛋白質、細胞などを含んでおり、食品に限らず、生化学あるいは医学的意義が存在する分野、例えば治療薬、補充療法薬の分野において広く利用可能である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】不凍蛋白質を含有してなることを特徴とする被乾燥物の凍結乾燥方法。

【請求項 2】被乾燥物に不凍蛋白質を内在させる工程を実施した後、該物資を凍結乾燥することを特徴とする被乾燥物の凍結乾燥方法。

【請求項 3】被乾燥物が少なくとも食品、植物、薬品、蛋白質または細胞であることを特徴とする請求項 1～2 いずれか 1 項記載の被乾燥物の凍結乾燥方法。

【請求項 4】不凍蛋白質が、少なくとも植物、魚、昆虫 または微生物由来である、請求項 1～3 いずれか 1 項記載の被乾燥物の凍結乾燥方法。

【請求項 5】不凍蛋白質を含有してなることを特徴とする凍結乾燥物。

【請求項 6】不凍蛋白質を含有してなることを特徴とする凍結乾燥食品。

【請求項 7】水分含量が 15% 以下であることを特徴とする請求項 5～6 のいずれか 1 項記載の凍結乾燥物。

【請求項 8】不凍蛋白質を含有してなることを特徴とする凍結乾燥用保護剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、凍結乾燥方法に関し、不凍蛋白質を含有してなる被乾燥物の凍結乾燥方法、および得られる凍結乾燥物に関する。また、食品、植物ならびに細胞などに不凍蛋白質を内在させた後、凍結乾燥する方法の提供に関する。さらに、不凍蛋白質を含有し有効成分とする凍結乾燥用保護剤に関する。

【0002】

【従来の技術】従来、野菜や水産物、畜肉などの食品を、色や風味、栄養分を極力劣化させずに保存したり、生薬などの薬品あるいは生細胞を、薬理成分、生体成分の喪失や破壊を避けつつ保存するための有力な方法として、凍結乾燥技術が使用されている。凍結乾燥は、熱をかけずに乾燥させるため色や風味、味質、栄養分あるいは生体活性成分などが保持される上、乾燥によって嵩が減らないため見栄えもよいという特長を持っており、様々な利用がなされている。しかし、通常、凍結乾燥に供す前にあらかじめ凍結させる段階で生じた氷結晶は、凍結中や保存中あるいは凍結乾燥中に成長し、凍結乾燥品の組織に氷結晶大の破壊を招く。このことが凍結乾燥品の硬さの低下、もろさ、見栄えの悪さを引き起こし、処理前に比べて本来の性状を留めず、期待される効果が得られていないのが現状である。これを防止する目的で、グルコースやシュクロース、グリセロール、トレハロースなどの糖類を添加する方法が用いられていた。しかし、これらの方法でも凍結乾燥品の品質は充分とは言えず、大量に添加することによる甘味の増加や、凍結乾燥中の発泡、凍結乾燥後の空気中の水分を吸湿して、凍結乾燥物の品質や機能の劣化につながり、実際に使用する

ことはほとんど不可能であり、大きな問題となっている。

【0003】植物や魚類、昆虫などが産生する不凍蛋白質複合体として「不凍活性物質」が知られている。この不凍蛋白質は、氷の結晶表面を認識し、氷結晶表面に吸着し氷結晶の成長を抑制し、すなわち凍結保存や解凍中の氷の再結晶化を極力防止する。また、氷の凍結点の低下作用を有することが知られている蛋白質である。そのため不凍蛋白質は、霜害防除、冷凍食品の品質向上、細胞や組織の保存、低温手術での利用などにおける有用性が指摘され、アイスクリームなどの氷菓子への添加（米国特許第 472500 号）報告、冷凍保存する食肉にあらかじめ浸漬するなどの応用が期待されている。これらは、冷凍する際に生じる氷結晶の成長から奏される舌触りの改良や、解凍後に生じるドリップの発生を抑える効果を持っているとされている。しかし、この不凍蛋白質を凍結乾燥品に利用し、新しい食感などの効果を有した凍結乾燥物を得ることについてはこれまで知られていなかった。

20 【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上述の従来技術における問題点を鑑みて検討されたもので、凍結乾燥において食品本来の味質や風味を損なうことなく、硬さや形状といった品質を保持することができる方法を提供するものである。本発明はまた、冷凍処理による氷結晶の成長を抑制し、細胞膜、細胞壁など食品組織の破壊を防止すると共に、凍結乾燥後、良好なテクスチャーを有する新規な凍結乾燥品を提供することにより、食生活を豊かにすることを課題とするものである。

30 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、解決困難な上記課題を解決すべく、極めて有効かつ効果的な被乾燥物の凍結乾燥方法を提供するため、鋭意研究を行った結果、不凍蛋白質に着目し、不凍蛋白質を含有し凍結乾燥することにより、効率よく、かつ品質を安定に、被乾燥物を乾燥しうる方法を見出した。本発明の不凍蛋白質を有効成分とした凍結乾燥用保護剤を用い凍結乾燥処理することで、品質が良好で、かつ新規な凍結乾燥物を提供可能であることをも見出した。

40 【0006】本発明は、不凍蛋白質を含有してなる被乾燥物を凍結乾燥する方法に関し、得られた乾燥品についても提供可能である。すなわち、食品、植物、薬品、蛋白質、細胞などを含む被乾燥物に、不凍蛋白質を取り込ませたり、浸透させることなどで内在させた後、該被乾燥物を凍結乾燥処理する方法を提供し、さらには、得られた凍結乾燥物を提供することを特徴とする。本発明の凍結乾燥物は水分含量が 15% 以下であり、他方には不凍蛋白質を内在する被乾燥物を水分含量が 15% 以下まで乾燥することを特徴とする。また、本発明により、不凍蛋白質を有効成分として含有してなる凍結乾燥用保護

剤を提供可能である。

【0007】本発明の不凍蛋白質は、冷海水中で生息している魚、植物などに種々存在していることが知られており、相対分子量 (Mr) が約 3,300~140,000 の不凍ポリペプチド (AFP) であり、Mr が約 2,500~34,000 の範囲の糖蛋白質 (不凍糖蛋白質または AFGP) をも含有する。Ananthanarayananら (Life Chemistry Reports 7:1-32 (1989))、DeVriesら (Ann.Rev.Physiol.45:245-260 (1983))、Daviesら (FASEB j.4:2460-2468)、Warrenら (米国特許第 5118792号) により不凍蛋白質が述べられている。現在、数種類の異なる不凍蛋白質が様々な冷水魚から確認されている。例えば、AFP (I型) はアラニンに富み (α ヘリックスポリペプチド)、カレイやカジカに存在している。AFP (II型) はハーフシスチンに富み、ケムシカジカ、ニシンやキュウリウオ科の魚に存在している。AFP (III型) は球状タンパク質がゲンゲやオオカミウオを含む数種のゾアルコイド科に存在している。南極魚と南北両極タラに見られる不凍糖蛋白質は、主に、トレオニル残基に結合した二糖を含むトリペプチド反復 (Ala-Ala-Thr) からなっている。AFPとAFGPは構造上異なるが、氷表面に結合することにより氷晶増殖を阻止する能力が共通している。現在AFPとAFGPは血清から単離されており、そのDNA配列は肝臓からのcDNAクローニングにより推測されている。現在までに記載されたタンパク質の全ては、ポリペプチドの分泌の役割を示すシグナルペプチドを含む大きな前駆体ポリペプチドとして合成されている。本発明の不凍蛋白質は、AFP、AFGPを含有する抽出物であっても、それぞれに単離精製されたもの単独、もしくはそれらの混合物であってもよい。使用時に水溶性が求められる場合は、好ましくは水溶性の高いAFP (II型) あるいはAFP (III型) を使用するのがよい。本発明の不凍蛋白質は、少なくとも植物由来、魚由来、昆虫由来、微生物由来を使用し、1種単独もしくはそれらを組合せて使用しても良く、食品以外の用途で利用する植物に適用する場合であれば、遺伝子組み換え生物により生産された不凍蛋白質であってもよい。不凍蛋白質の製造方法は、生物から抽出、精製する通常の方法に順じて行えばよい。

【0008】本発明の不凍蛋白質の添加量は、適用する被乾燥物の形態、大きさ、種類、性質、凍結乾燥条件、浸漬条件、またこの不凍蛋白質を含有する凍結保護剤の成分などに応じて適宜の範囲として使用することができる。一般に乾燥固形分に換算して該重量の90%以下、好ましくは0.001~50%とする事ができる。例えば、食品 (名称:馬鈴薯、大きさ:15×15×15mm) 100重量%に対し10重量%以下である。好ましくは1重量%以下であり、より望ましくは0.0001~1.0重量%である。さらに、不凍蛋白質を含有して

なる凍結乾燥用保護剤は、少なくとも不凍蛋白質を含有し、該不凍蛋白質は上記の添加量から濃度を算出し使用すればよい。副成分としてプロテアーゼ活性の阻害物質を含有することが好ましい。プロテアーゼ活性を有する物質を含有する被乾燥物の凍結乾燥に用いる場合は、被乾燥物のプロテアーゼ活性を失活させた後、凍結乾燥してもよいし、該プロテアーゼの作用しないpHなどの条件で、不凍蛋白質を内在させ凍結乾燥してもよい。

【0009】本発明の凍結乾燥は、不凍蛋白質を内在させた被乾燥物を真空凍結による乾燥処理、冷凍後に加熱処理した乾燥処理、および冷凍後に脱水処理した乾燥処理などについても含有する。例えば、真空凍結乾燥方法による場合では、不凍蛋白質を内在した被乾燥物を凍結させ、約10torr以下、好ましくは2~0.5torrの減圧下で処理を行ない、気化により水分を除去すればよい。さらに、本発明の凍結乾燥に際しては、凍結しない温度もしくは凍結温度にて予備冷凍した後、凍結乾燥してもよい。真空凍結乾燥の方法および条件は、通常の方法や条件に従えば良く、特に限定されるものではない。例えば、被乾燥物を0~40℃で予備凍結させた後、氷点下の真空室 (絶対圧力が例えば0.5torr以下) 内に封入して、品温45~50℃程度まで上昇させ、この温度でさらに120~180分乾燥をする方法でもよい。さらに本発明の凍結乾燥は、冷凍した後に乾燥すばよく、冷凍後の乾燥方法は特に限定されるものではなく、天日乾燥、熱風または冷風乾燥、赤外線加熱乾燥など各種の方法を適用でき、乾燥時の雰囲気圧力も大気圧でも減圧下であってもよい。本発明の凍結乾燥方法を用いた被乾燥物中成分の抽出方法にも関する。本発明により得られる凍結乾燥物の水分含量は、15%以下、好ましくは10%以下、より好ましくは5%以下である。

【0010】また、本発明の食品、植物、薬品、蛋白質、細胞などについて説明する。本発明の物質とは、少なくとも食品、植物、薬品、蛋白質、細胞などを含有し、それらの一種単独もしくはそれらを組合せて使用しても良い。本発明において、該物質は凍結乾燥の被乾燥物、その中間加工物、またその最終製品である凍結乾燥物であって、本発明の不凍蛋白質、もしくは本発明の不凍蛋白質を含有する凍結乾燥用保護剤を含有するものである。本発明の食品は、本発明の不凍蛋白質を内在および含有などしてなる食品である。例えば、トマト、タマネギ、ニンジン、大根、ジャガイモ、ゴボウ、カボチャ、ピーマン、キャベツ、カリフラワー、アスパラガス、オクラ、ネギ、キュウリ、カボチャ、ナス、スイカ、ほうれん草、カリフラワーなどの野菜、豆などの穀物、イチゴ、柿、リンゴ、レモン、サクランボ、梨、桃、ブルーベリー、メロンなどなどの果物類、種実類、鮭、鯛、鰻、いか、えび、ほたてなどの魚介類、獣鳥肉類、卵類、乳類、きのこ類、藻類、菓子類、嗜好アルコールや茶などの嗜好飲料類、ソースなどの調味料類、香

辛料類、また豆腐、こんにゃく、寒天などの加工品が挙げられ、またはこれらを煮沸調理などの加工、調理した食品も含まれる。また、本発明により得られる凍結乾燥食品は、水で戻して食してもよいし、水に戻さずそのまま喫食するスナック菓子のような形態でもよい。さらに、粉末の状態で食することもできる。さらに、この粉末を錠剤、糖衣錠、顆粒状に加工し、例えばパンおよびケーキ類、味噌、豆腐、キャンディー、ヨーグルト、ふりかけ、だしの素、スープの素、粉末醤油などの粉末調味料などの各種食品の原料中や、栄養保持食品として使用することもできる。本発明の食品の凍結乾燥方法は、不凍蛋白質を有効成分として上記の食品に含ませることに特徴を有している。その結果、良好な食感を持つ新規な凍結乾燥食品を提供可能である。

【0011】本発明の植物は、本発明の不凍蛋白質を内在、含有、および接触などしてなる植物である。例えば、穀物、野菜、花卉、果樹、果実などすべての植物、およびこれらの収穫物を意味する。また、植物には苗、種子も包含される。例えば、植物の苗や、カーネーション、デルフィニウム、スイートピー、カスミソウ、ユリ、フリージア、チューリップ、洋ラン、菊の花、桜の花、菜の花など、圃場で栽培した花卉類の植物、鉢に移植された花卉類の植物などすべての有用植物を挙げることができる。花卉類の植物茎の中間部や、下端部の所で根を切り離して作られる切り花、切り葉にも適用可能である。また、本発明の不凍蛋白質を用いた植物の凍結乾燥方法は、植物の鮮度を保持するための優れた方法に関するものである。本発明の不凍蛋白質を凍結保護剤として用いた植物の凍結乾燥方法は、植物を不凍蛋白質の含有する溶液に浸漬、噴霧、塗布など接触させ、あるいは不凍蛋白質の含有する沸騰溶液(pH6~11)に浸漬、噴霧などブランチングを行なった後、再度不凍蛋白質を接触して凍結乾燥する。例えば、花卉を凍結乾燥する際には、花卉の表裏に不凍蛋白質を含有する沸騰溶液を噴霧後、または／および不凍蛋白質を含有する溶液に浸漬後凍結乾燥すればよい。本発明の植物の凍結乾燥方法は、不凍蛋白質を有効成分として上記の植物に施すことに特徴を有している。その結果、花類を長期に保存することができ、かつ、さらに収穫時の色調を保持し元来の新鮮な状態を維持することができ、甚だしい萎縮や変質を起すことはなく、市場に提供することができる。また、別法として、植物の栽培時に不凍蛋白質を施用し、収穫された植物をそのまま、もしくは不凍蛋白質を収穫された植物に内在せしめた後凍結乾燥すればよい。

【0012】本発明の薬品は、本発明の不凍蛋白質を内在、含有、および結合などしてなる薬品である。本発明の薬品は、医薬品、血液製剤、薬理活性蛋白および薬理活性ポリペプチド類などからなる蛋白質製品、実験材料、研究用試薬が挙げられる。本発明の薬品を製造するには、本発明の薬品および不凍蛋白質を適量の水また

はリン酸緩衝液、酢酸緩衝液、ホウ酸緩衝液などの緩衝液に溶解し、必要に応じてpHを不凍蛋白質の至適領域に調整し、無菌濾過する。濾液をバイアルまたはアンプルなどの容器に分注し、次いで常法により凍結乾燥した後、密栓または溶閉することにより本発明の製剤を含む薬品を製造することができる。また、上記の濾液を凍結乾燥し、得られる粉末を上記の容器に分注し、ついで密栓または溶閉することによっても本発明の薬品を得ることができる。さらに、凍結乾燥を行うにあたっては、湿度、温度、および大気中の酸素による生存能・生殖能の劣化をできるだけ抑えるため、種々の補助剤、分散剤、保護剤、担体などの添加剤を投与すればよい。本発明の薬品の凍結乾燥方法は、不凍蛋白質を有効成分として上記の薬品に使用することに特徴を有している。その結果、薬品の成分を分解させることなく、安定性を増大させ、かつ凍結乾燥の加熱による夾雑ウイルスを不活性化し、その感染性を除く効果をも奏し、医療、臨床分野かつ研究分野において有用な薬品である。

【0013】本発明の蛋白質は、本発明の不凍蛋白質を内在、含有、および結合などしてなる蛋白質である。本発明の蛋白質は、蛋白質または蛋白質の断片ないしは化学的修飾を受けた蛋白質であり、血漿由来蛋白質、他の組織由来蛋白質、遺伝子組み換えや組織培養によって得られた蛋白質などが挙げられ、特に限定されるものではない。蛋白質として、例えば、抗体、免疫毒素などの抗体融合蛋白質、酵素、およびエリスロポエチン、ソマトスタチン、インスリン、サイトカイン類、インターフェロン類またはプラスミノゲン活性化因子などの蛋白質ホルモンなどが挙げられる。ここで蛋白質組成物についても含有され、例えば、血漿または組織抽出液、血漿または組織抽出液を各種分画法により処理して得た画分からなる溶液、遺伝子組換え宿主または組織の培養により得られる培養液、市販の蛋白質などが挙げられ、特に制限されない。さらには、界面活性剤、蛋白質安定化剤、プロテアーゼ阻害剤を添加して使用してもよい。本発明の蛋白質の凍結乾燥方法は、不凍蛋白質を有効成分として上記の蛋白質に使用することに特徴を有している。

【0014】本発明の細胞は、本発明の不凍蛋白質を内在、含有、および接触などしてなる細胞である。例えば、生物などの原核細胞、あるいは動物や植物などの真核細胞を挙げられる。微生物の属種は特に制限されるものではなく、サッカロマイセス(Saccharomyces)、ハンセンラ(Hansenula)、キャンディダ(Candida)、ミクロコッカス(Micrococcus)、スタフィロコッカス(Staphylococcus)、ストレプトコッカス(Streptococcus)、ロイコノストア(Leuconostoa)、ラクトバチルス(Lactobacillus)、コリネバクテリウム(Corynebacterium)、アルスロバクター(Arthrobacter)、バチルス(Bacillus)、クロストリジウム(Clostridium)、ノルカルディア(Norcardia)、ロドコッカス(Rhodococc

us)、ロドスピリリウム・ルブラム (*Rhodospirillum rubrum*)、ナイセリア (*Neisseria*)、エシェリシア (*Escherichia*)、エンテロバクター (*Enterobacter*)、セラチア (*Serratia*)、アクロモバクター (*Achromobacter*)、アエロモナス (*Aeromonas*)、アルカリゲネス (*Alcaligenes*)、フラボバクテリウム (*Flavobacterium*)、アセトバクター (*Acetobacter*)、モラクセラ (*Moraxella*)、ニトロソモナス (*Nitrosomonas*)、ニトロバクター (*Nitrobacter*)、チオバチルス (*Thiobacillus*)、グルコノバクター (*Gluconobacter*)、シュードモナス (*Pseudomonas*)、キサントモナス (*Xanthomonas*)、バークホルデリア (*Burkholderia*)、などの細菌、糸状菌、酵母などが挙げられる。シネココッカス *sp* (*Synechococcus sp*)、アナバエナ (*Anabaena*)などの藻類、更には原生動物、赤血球、白血球、腫瘍細胞、培養細胞、動植物細胞などの各種細胞を挙げることができる。動物細胞に関しては、例えば、骨髓液(造血幹細胞)、繊維芽細胞、腎臓細胞、皮膚細胞のなどが挙げられる。本発明の細胞の凍結乾燥方法は、不凍蛋白質を有効成分として上記の細胞に使用することに特徴を有している。細胞を培地で増殖させ、増殖後の細胞培養液、細胞を集めた後に細胞培養液、または細胞のみを凍結乾燥する。凍結乾燥する際には、安定化剤、緩衝剤などを適宜添加することができる。本発明の不凍蛋白質を用いることで、凍結乾燥時の浸透圧の均等化、表結晶の成長防止効果を有し、細胞膜、細胞壁などの保護について効果を奏し、有用な細胞の凍結乾燥品が提供可能である。

【0015】

【実施例】以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、本発明は、以下の実施例によって限定されるものではない。

【実施例1】10mgのType I 不凍蛋白質 (Canada AFP Inc.社製)と2gの寒天末(1級試薬 ナカライテック(株)社製)を100mlの蒸留水に溶かし、温めて十分に溶解させた。プラスチックトレーに充填し、常温で冷やして固まらせ、縦25mm、横45mm、高さ12mmの寒天ゲルを得た。コントロールとしては、不凍蛋白質を含まない寒天ゲルを作成した。金属板上に等間隔に並べ、マイナス30℃の冷媒上に1時間置き冷凍した。真空度1 torrで2~3日間凍結乾燥を行い、凍結乾燥寒天を得た。これについて、20代の女性パネラー5人による官能検査を行った。

【0016】凍結乾燥寒天の評価に関する官能試験は、本発明の上記の凍結乾燥方法で製造された寒天とコントロール寒天を使用して行った。試験項目は、色調、外観、食味、におい、歯ごたえ、後味、風味について行った。その結果、コントロール寒天の外観は粗く寒天組織が見られ、ばりばりと崩れるような歯ごたえであった。

不凍蛋白質を添加した凍結乾燥寒天は、組織が細かく、コントロール寒天に比べてしなやかで弾力性があり、食味、風味とも総合的にとても良好な凍結乾燥品であるとの結果が示された。

【0017】

【実施例2】市販の馬鈴薯 (*Solanum tuberosum*) を洗浄し、皮をむいてから1.5cm四方の大きさに切った。0.2mg/mlのType I 不凍蛋白質 (Canada AFP Inc.社製) 溶液20mlにて5分間煮沸によるブランチングを行った後、ブランチング処理した馬鈴薯を、あらためて同濃度の不凍蛋白質溶液中に移し、4℃の該溶液中で5時間浸漬した。コントロールとしては、不凍蛋白質の代わりに蒸留水を用いた。該馬鈴薯の水分を軽く拭き取った後、金属板上に等間隔に並べ、業務用冷凍冷蔵庫(三洋電機株式会社製 SRR-MV1883C4)でマイナス20℃、12時間冷凍保存した。その後、真空度1 torrで24時間凍結乾燥を行い、凍結乾燥品の馬鈴薯を得た。

【0018】本発明による冷凍方法で凍結乾燥した馬鈴薯と、コントロールの馬鈴薯の硬さを比較した。硬度の測定は、直径20mmの円柱形プランジャを取り付けた食感分析計(英弘精機株式会社製 TA-XT2)を使用して、試料台上昇速度12 (cm/分)、DISTANCE 80%の測定条件で行ったものである。また、測定の試行回数は、それぞれ5回行い、表1には、上記各馬鈴薯の硬度の平均値を示した。その結果、コントロールの馬鈴薯は、組織が脆くなり崩れやすかった。不凍蛋白質を使用した本発明の凍結乾燥馬鈴薯は、組織がよりしっかりとしており硬かった。食感分析計による測定値からも、不凍蛋白質を使用することによる組織の保護効果が確認できた。

【0019】

【表1】

| | 硬さ (N.g) |
|--------|----------|
| コントロール | 238 |
| 不凍蛋白質 | 270 |

【0020】

【実施例3】市販の野菜である蕪 (*Brassica rapa*)、筍 (*Phyllostachys pubescens*)、馬鈴薯 (*Solanum tuberosum*)、金時人参 (*Daucus carota*)、マッシュルーム (*Agaricus bisporus*) を、各々1.3cm四方の大きさに切った。90℃の湯で60分間ブランチングした後、5μg/mlのType I 不凍蛋白質 (Canada AFP Inc.社製) 溶液または25μg/mlの氷核活性細菌(和光純薬工業株式会社製)懸濁液20mlに4℃で浸漬し、タイテック社製の真空ポンプで1時間減圧し、内部まで液を浸透させた。コントロールとしては、20mlの蒸留水に浸漬させ減圧浸透させ

たものを用いた。水分を軽く拭き取った後、金属板上に等間隔に並べ、マイナス40℃のメタノール上に1時間置き冷凍した。真空度1 torrで2～3日間凍結乾燥を行った。

【0021】得られた凍結乾燥野菜の破断応力測定を行った。破断応力測定は、直径3mmの円柱状プランジャを取り付けたタケトモ電機株式会社製テンシプレッサー

TTP-50BXを用いて、試料台上昇速度12 (cm/分)、歪率80%で圧縮する条件で行った。上記それぞれの野菜について、測定回数は10回行い、コント

ロールおよび不凍蛋白質添加した凍結乾燥野菜、氷核活性細菌を添加した凍結乾燥野菜について各々の破断応力の平均値を表2に示した。不凍蛋白質を添加した凍結乾燥野菜は、コントロールおよび氷核活性細菌を添加した凍結乾燥野菜に比べて各試料の組織のきめが細かく硬さが改善されており、より生の野菜に近い良好な食感を得ることができた。

【0022】

【表2】

| 硬さ (kg/cm ² ・cm) | 糖 | 水分 | 全糖人参 |
|--------------------------------|-----|-----|------|
| コントロール | 270 | 366 | 761 |
| 不凍蛋白質 | 318 | 559 | 1035 |
| 氷核活性細菌 | 200 | 194 | 920 |

【0023】

【発明の効果】このように、本発明の不凍活性蛋白を用いることで、良好な食感を有する新規な凍結乾燥食品が提供できることが示された。本発明の不凍蛋白質は、食品については風味、食感が良好であり、形状を保持することが可能となり、凍結乾燥時においても食品や細胞内の水分を失う時、不凍蛋白質が細胞内に入り込んで形状を保つ働きををすると思われる。そのために凍結や凍結乾

燥時に不凍蛋白質を用いることにより、凍結乾燥後の色調、風味、栄養分あるいは生理活性成分などが保持されたままであり、かつ乾燥による嵩の減少防止がなされ、それらばかりかさらには品質の劣化や、形状の崩壊や吸湿などを防止することが可能となった。さらに、本発明は、生化学あるいは医学的意義が存在する分野、例えば治療薬、補完療法薬の分野において広く利用可能である。

フロントページの続き

(72)発明者 本田 通済
広島県福山市箕沖町95番地7 池田食研株式会社内

(72)発明者 佐藤 美加
広島県福山市箕沖町95番地7 池田食研株式会社内

(72)発明者 石川 愛子
広島県福山市箕沖町95番地7 池田食研株式会社内

Fターム(参考) 3L113 AC21 BA39 DA01 DA23
4B022 LA05 LJ04 LR06
4C076 AA29 EE41 GG06

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-19

(P2004-19A)

(43) 公開日 平成16年1月8日 (2004.1.8)

| (51) Int.Cl. ⁷ | F I | テーマコード (参考) |
|---------------------------|-------------|-------------|
| A23L 3/36 | A23L 3/36 A | 4B017 |
| A23L 1/272 | A23L 1/272 | 4B018 |
| A23L 1/30 | A23L 1/30 Z | 4B022 |
| A23L 1/305 | A23L 1/305 | 4B027 |
| A23L 2/70 | A61K 7/00 J | 4C076 |

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 10 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|--------------|------------------------------|----------|--------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2002-151621 (P2002-151621) | (71) 出願人 | 000210067 |
| (22) 出願日 | 平成14年5月24日 (2002.5.24) | | 池田食研株式会社 |
| (31) 優先権主張番号 | 特願2002-90038 (P2002-90038) | | 広島県福山市箕沖町95番地7 |
| (32) 優先日 | 平成14年3月27日 (2002.3.27) | (72) 発明者 | 石川 愛子 |
| (33) 優先権主張国 | 日本国 (JP) | | 広島県福山市箕沖町95番地7 池田食研株式会社内 |
| | | (72) 発明者 | 本田 通彦 |
| | | | 広島県福山市箕沖町95番地7 池田食研株式会社内 |
| | | (72) 発明者 | 佐藤 美加 |
| | | | 広島県福山市箕沖町95番地7 池田食研株式会社内 |
| | | (72) 発明者 | 小村 啓悟 |
| | | | 広島県福山市箕沖町95番地7 池田食研株式会社内 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 変性防止剤および液体組成物

(57) 【要約】

【解決手段】 不凍蛋白質を使用した変性防止剤およびそれを含む食品、化粧品、医薬品などの液体組成物を提供する。また、変性防止効果を有する不凍蛋白質を使用した変性防止方法を提供する。

【効果】 不凍蛋白質を使用することで液体組成物中の有用物質の変性防止や、濁り、沈殿などの澱の発生防止した液体組成物を提供可能である。また、本発明の不凍蛋白質を使用した液体組成物は、常温条件、冷蔵条件だけでなく、冷凍および冷解凍を繰り返すような条件においても、有用物質の不活化、濁りや沈殿現象などを生じず、製造直後と同等の品質の製品である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

不凍蛋白質を含むことを特徴とする変性防止剤。

【請求項 2】

請求項 1 記載の変性防止剤を含むことを特徴とする液体組成物。

【請求項 3】

液体組成物が、蛋白質あるいは／ならびに細胞を含む組成物、食品、化粧品、または医薬品のうち少なくとも 1 種である請求項 2 記載の液体組成物。

【請求項 4】

請求項 2 ～ 3 のいずれか 1 項記載の液体組成物の冷凍品。

10

【請求項 5】

少なくとも不凍蛋白質を使用することを特徴とする変性防止方法。

【請求項 6】

蛋白質、脂質、栄養成分、色素成分、香氣成分のうち少なくとも 1 種の変性を防止することを特徴とする請求項 5 記載の変性防止方法。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、不凍蛋白質を含む新規な変性防止剤に関し、該変性防止剤を含む液体組成物に関する。

20

また、本発明は製造後の保存時においても濁り物質や沈殿物質の発生、変色、脂質などの変性が抑制された食品、化粧品、試薬および医薬品を提供する。

さらに、本発明の不凍蛋白質を含む変性防止剤を使用することで、取り扱いが簡便で、かつ長期間保存安定な液体組成物を提供する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

近年、コーヒー、紅茶、ココア茶飲料をはじめとする液体食品が、缶またはペットボトルなどに充填した商品として提供されている。この包装形態は消費者の支持を得てその生産量は増加の一途をたどっている。このような液体食品としては、例えば、ウーロン茶、紅茶、緑茶またはそれ以外の原料を使用する茶飲料などが知られている。さらに、茶、コー

ヒー、ココア、ブドウ、リンゴなどの飲料原料にはポリフェノールが含まれている、該ポリフェノールは特有の苦み、渋味を有しており、ヒト体内において過酸化脂質の生成を抑制する抗酸化能を有するなど、動脈硬化をはじめとした各種の生活習慣病を予防し得る物質として注目されている。これらの飲料を商品化するにあたっては、それぞれいくつかの問題がある。例えば、緑茶飲料を製造後、保存中に生じる沈殿物などの防止がある。茶飲料は、茶葉からの茶抽出物を製造後、これを濾過などの手段で清澄化した場合には、製造直後において沈殿物質は認められない。しかし、時間が経過するとともに徐々に沈殿物質が生成しはじめ、条件によっては液中に浮遊するようになる。

30

【 0 0 0 3 】

また、コーヒー飲料に関しては、大別すると、コーヒー抽出液に砂糖などの甘味料だけを添加し、焙煎したコーヒー豆の粉碎物から抽出したときのままのコーヒー本来の色調を失わないようにしたブラックコーヒータイプと、コーヒー抽出液に甘味料とミルクとを添加したミルクコーヒータイプとがある。ブラックコーヒータイプは、ミルクを含まないのでミルクによる白濁がなく視覚的に清涼感に富み、とくにアイスコーヒーとして飲用に供される場合に好ましい。一方、ミルクコーヒータイプは、ミルクの添加により口当たりが良くなると共にこくのある味が得られる。しかし、ミルクコーヒータイプは、ミルクから起因する水溶性タンパク質とコーヒー中にあるポリフェノールが、水中で結合して白濁物質や沈殿物質を形成する。これらの沈殿物質は、透明なペットボトルや瓶に充填した製品では品質の劣化と誤認され、商品価値を低下することになるので大きな問題となる。また、醤油やだしなどの液体食品に関しても、製造時や流通保存中に蛋白質や微細な油滴による

40

50

濁りを呈することが問題とされてきた。

【 0 0 0 4 】

現在においても、その問題が十分には解決されておらず、新しい解決手段の提供が求められている。従来、緑茶飲料に関しては、該沈殿物質の生成を防止する手段として、水易溶性のフラボノイド類あるいはフラボノイドの配糖体を緑茶抽出物に添加する方法（特開平2-100632号）、茶葉に植物組織分離酵素剤を作用させて茶葉の植物組織を分解し微細粉茶を得る方法（特開平5-316952号）、コーヒーに関しては、コーヒー抽出液に強アルカリ性塩を添加することにより保存中の沈殿の発生を防止する方法（特許2920826号）、予めL-アスコルビン酸、クエン酸、酒石酸、リンゴ酸、フマル酸、乳酸などを添加したポリフェノール含有液に、ゼラチンを添加しても沈殿が生じず、清澄なゲル状食品を得る方法（特開平10-337158号公報）などが知られている。しかしながら、これらの方法は、濁り物質や沈殿物質の形成抑制作用が不十分で、適用範囲が狭く、工程が煩雑であるなどの問題や、飲料本来の風味が低下するなどの問題があり、いずれも十分に満足のいくものではなかった。

【 0 0 0 5 】

食品には、蛋白質、脂質、糖質、ビタミン、ミネラルなどの成分が含まれている。これらの栄養成分は、食品の保存中にも変質を少なく保持する必要がある。さらに、食品の品質評価の要素である色調、味質、香気、食感なども優れている必要がある。その中でも、色調の悪変は、食品の鮮度変化や風味の劣化と並行して生じたり、光、熱、酸化及び酵素反応などにより生じる。色調が悪変し易い色素としては、主に動物のヘム色素（ミオグロビン）、カロチノイド類、植物のポリフェノール類（アトシアン、フラボン、カテキン、タンニン）、クロロフィルなどがある。例えば、ホウレンソウ、サヤエンドウなど緑色の野菜に含まれる緑色色素であるクロロフィルの退色は、▲1▼クロロフィル分子中のマグネシウム原子が水素原子に置換され褐色のフェオフィチンが生成する、▲2▼クロロフィラーゼによりフィチル基が除去されクロロフィリドが生成し、更にフェオホルバイドとなる酵素褐変反応、▲3▼リポキシゲナーゼにより酸化され無色の分解物となる酵素反応が単独または複合的に関与している。これら色素の退色および変色の防止方法として、主に酸化防止剤の添加、短時間のブランチングが行なわれているが、食品に酸味など望まない味質が付与されたり、加熱による他の成分変化などが生じ、目的とする食品の種類の限定されたり、効果を発揮するまでの添加量が制限されるなどの欠点を有し、十分に満足できる効果が得られていない。

【 0 0 0 6 】

また、食品の必須物質であり、栄養価に大きく関わる脂質は、常温ならびに冷凍温度において酸化や酵素分解による劣化が生じる。その結果、異臭発生、変色、味質の変化や、酸敗現象が起こる。これらの現象は、食品の保存中に脂質の一部が酵素リパーゼの作用で加水分解し、遊離脂肪酸が増加することにより酸化が促進される。さらに、水に比べて油には酸素が非常によく溶けることも原因の一つである。この様に脂質が劣化した結果、異味異臭の発生、栄養価の低下による商品価値が低下し問題となっている。脂質の劣化の防止方法として、ブランチングによる酵素失活、より低温領域下での保存、酸素非透過性フィルム、グレーズ処理、抗酸化剤の添加などを単独あるいは組み合わせて実施しているが、満足すべき防止方法が得られていない。

【 0 0 0 7 】

遺伝子組み換え技術を含む近年の生化学分野における技術の進展はめざましいものがあり、社会への貢献の大きさも益々注目されるようになってきた。それらの研究に利用される試薬の数は年々増加している。酵素蛋白質や細胞類のなかには、長期間安定に保存するために冷凍状態で流通しているものもあるが、多くの場合、その機能を保ち安定化するために著量のグリセロールや糖類、あるいはDMSOなどが添加されている場合が多い。これらは概ね有効とされているが、実際に酵素や細胞を使用する際の反応環境や培養環境に悪影響を与えることから使用前の除去が必要であったり、場合によっては高い浸透圧が細胞の機能に損傷を与えたりすること、保存条件を厳密に管理することが煩雑であるなどの問

題点があり、より良い安定剤が求められてきた。

【0008】

また簡便な作業性を有する液体試薬の利用は盛んになる一方で、より保存安定な液体試薬も特に望まれている。一例として生化学検査においては、汎用型の全自動分析装置で測定するのが一般的となってきた。この自動分析装置用の診断薬に利用される酵素に要求される重要な要件は基質特異性と安定性である。ここで、試薬調製の容易な液体試薬が一般的となり、酵素の安定性はさらに重要視されるようになってきたが、反応系を阻害せず不安定な酵素を含む溶液を安定化させることは容易でなく、様々な煩雑な検討を経た工夫が必要で、これを解決する物質が待望されている。

【0009】

従来の冷凍菓子には、冷凍した状態で流通する冷凍流通タイプの冷凍と、冷凍温度でない温度か常温で流通し食べる前に冷凍する常温流通タイプのものがある。従来の冷凍流通タイプの冷凍菓子では、即時に喫食可能である利便さや、硬さを有するなど品質はよいものが多い。しかし、生産者から消費者への流通温度を、例えば常に約 -18°C に管理しなければならず、一度該冷凍が融けると品質が極端に低下するため、流通時における温度管理に注意を要するばかりでなく、該温度管理のエネルギーコストが必要であるなどの問題点がある。それに対して、従来の常温流通タイプの冷凍菓子では、流通時における温度管理がそれほど必要でなく取扱いが容易である。このような従来の常温流通タイプの冷凍菓子は、氷結晶の生成を主にして配合が考察されたものであり、冷却することによって凍結し、すなわち、冷凍することができる。ところが、従来の常温流通タイプの冷凍菓子は、冷凍機能にのみ主眼が置かれ、冷凍した状態からたとえば室温で放置してやや溶けた状態にしなければ食べることが困難であるほど、冷凍した状態では硬すぎた。また、冷凍品に溶質濃度の高い部分と低い部分が生じ、望むべき味が得られにくいという問題もあった。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

上記のように液体組成物は、製造後の製品の保管時に変性した蛋白質が沈殿したり、色素や有用成分が変質、分離することにより外観や生理活性を含めた品質上の価値を著しく失うことが大きな問題となっている。これを防止する技術として、ワインやビールなどで見られる、澱である濁りや沈殿の原因となる蛋白質や酵母を除くために、タンニン、ゼラチン、ベントナイト、キトサン、卵白などの清澄剤を加え、原因物質を沈殿させた後、濾過して取り除く工程が知られている。あるいは不安定な酵素や細胞類を安定化するために、各種糖類やグリセロール、BSA、DMSOなどが添加される場合があるが、これら添加する清澄剤、安定化剤の種類と量の決定、あるいは濾過作業には多大な労力が必要という問題がある上、清酒やみりんなどに良く使用されるゼラチンは牛由来であるため残存が嫌われ問題となっている。

【0011】

また、従来の常温流通タイプの冷凍菓子では、冷凍時の液体中の氷結晶を得るための配合であり種々の制約があるばかりか、冷凍条件によっては針状結晶を生成したり、乳成分の分離沈殿がみられるなど、冷凍流通タイプの冷凍菓子と同等の食感を呈しない。また、冷凍流通タイプの冷凍菓子と比べて硬いだけでなく、常温や冷蔵時の保存時に冷凍用の内容物が沈殿したり、冷凍による比重差沈殿を生じるなど品質において劣るという問題点があった。それゆえに、常温で流通することができ、従来の常温流通タイプの冷凍菓子に比べ、よりよい品質の冷凍菓子が求められている。

【0012】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、解決困難な上記課題を解決すべく、極めて有効でかつ効果的な方法を提供するため鋭意研究を行った結果、不凍蛋白質の有する変性防止効果、沈殿防止効果などに着目し、不凍蛋白質を使用することで有用物資の不活化、沈殿の発生防止などに顕著な効果を有し、かつ効率よく品質を安定にしよう液体組成物を見出した。本発明は、不凍蛋白質を有効成分として含む変性防止剤を使用し、液体組成物中の濁り物質や沈殿物質の発生

を防止することで、品質が良好で、かつ新規な液体組成物である食品、化粧品や医薬品が提供可能であることをも見出した。本発明は、酵素などの蛋白質や細胞類の不活化を防止した液体組成物を提供し、それらの保存、利用に非常に有効な手段をも提供する。また、本発明は、冷凍菓子においても食品本来の食感や風味を損なうことなく、硬さや形状といった品質を保持することができ、消費者に大きく資する製品が提供可能であることも見出した。加えて本発明は、不凍蛋白質を使用することで、液体食品に見られる濁り物質の発生や沈殿物質の発生を防止し、変色を抑制することにより、液体食品の外観を含めた商品価値を著しく向上させることを可能とし、人類の食文化の向上に大きく資する手段を提供するものである。

【0013】

本発明の不凍蛋白質は、冷海水中で生息している魚などに種々存在していることが知られており、相対分子量(Mr)が約3,300~140,000の不凍ポリペプチド(AFP)であり、Mrが約2,500~34,000の範囲の糖蛋白質(不凍糖蛋白質またはAFGP)をも含有する。Ananthanarayananら(Life Chemistry Reports 7:1-32(1989))、DeVriesら(Ann. Rev. Physiol. 45:245-260(1983))、Daviesら(FASEB J. 4:2460-2468)、Warrenら(米国特許第5,118,792号)、Griffithsら(Plant Physiology 119:1361-1369(1999))により不凍蛋白質が述べられている。現在、数種類の異なる不凍蛋白質が様々な冷水魚から確認されている。例えば、AFP(I型)はアラニンに富み(αヘリックスポリペプチド)、カレイやカジカに存在している。AFP(II型)はシスチンに富み、ケムシカジカ、ニシンやキュウリウオ科のワカサギなどにも存在している。AFP(III型)は球状の蛋白質がゲンゲやオオカミウオを含む数種のゾアルコイド科に存在している。1997年には、カジカからIV型のAFPも発見されている。南極魚と南北両極タラに見られる不凍糖蛋白質は、主に、トレオニル残基に結合した二糖を含むトリペプチド反復(Ala-Ala-Thr)からなっている。AFPとAFGPは構造上異なるが、氷表面に結合することにより氷晶成長を阻止する能力が共通している。現在AFPとAFGPは各種単離されており、そのDNA配列が決定されているものもある。本発明の不凍蛋白質は、AFP、AFGPを含有する抽出物であっても、それぞれに単離精製されたもの単独、もしくはそれらの混合物であってもよい。本発明の不凍蛋白質は、少なくとも植物由来、魚由来、昆虫由来、微生物由来を使用し、1種単独もしくはそれらを組合せて使用しても良く、遺伝子組み換え生物により生産された不凍蛋白質であってもよい。不凍蛋白質の製造方法は、生物から抽出、精製する通常の方法に順じて行えばよい。

【0014】

本発明の変性防止剤は、少なくとも以上の通りの不凍蛋白質を含有することで、対象とする物質の品質低下、あるいは変質を起こす度合いを極めて低下し、対象の物質が有する目的の性質を著しく延長する作用を有する。飲料について例示すれば、例えば濁り物質の発生を防止または低下し、食品としての商品価値を向上し商品期限を延長するものである。さらに本発明の変性防止剤の作用として、例えば、濃と称される濁り物質、沈殿物質、フロックなどの発生や、色素の退色を含む変色、脂質などの酸化、香気成分の低減あるいは悪変、有用成分の不活性化、風味・呈味の劣化などの抑制作用あるいは防止作用などを含めた変性防止効果を有する。本発明の変性防止剤は、該不凍蛋白質を溶液または粉末形態として製剤化することができ、あるいは添加対象とする製品の性状や工程などに合せて、顆粒状やペースト状の最も効果が期待できる剤形に加工することができる。また、本発明の変性防止剤は、前記の不凍蛋白質と他の成分との混合形態であってもよい。そのような成分としては、不凍蛋白質の効果を損なわないものであって、かつ液体組成物の加工やその機能などに好ましい効果を有するものを使用することができる。さらに、本発明の不凍蛋白質を含有してなる変性防止剤は、該不凍蛋白質は下記の添加量から濃度を算出し使用すればよい。副成分として活性型のプロテアーゼが存在する場合にはプロテアーゼ活性阻

10

20

30

40

50

害物質を含有することが好ましい。プロテアーゼ活性を有する物質を含有する液体組成物に使用する場合は、該プロテアーゼの作用しないpHなどの条件で、不凍蛋白質を内在させ使用してもよい。

【0015】

本発明の不凍蛋白質の添加量は、適用する液体組成物の種類、性質、またこの不凍蛋白質を含有する変性防止剤の成分などに応じて適宜の範囲として使用することができる。一般に乾燥固形分に換算して該重量の90%以下、好ましくは0.001~50%とする事ができる。例えば、飲料であるコーヒーの乾燥固形分100重量%に対し50重量%以下である。好ましくは20重量%以下であり、より望ましくは0.001~10重量%である。

10

【0016】

本発明の液体組成物は、不凍蛋白質を含む液体の組成物であり、例えば、蛋白質や細胞を含む組成物、食品、化粧品、医薬品が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の液体組成物の形態についても限定されず、例えば、常温品、冷凍品またはそれらの中間状態の形態で、保存、流通あるいは使用されるものも含まれる。

本発明の食品は、不凍蛋白質を含む食品であり、例えば食用油、みそ、ソース、みりん、みりん風調味料、発酵調味料、酢、つゆ、たれなどの調味料類、甘味料、スープ、シチュー、コーヒー、紅茶、ココア、茶飲料、野菜飲料、果実飲料、炭酸飲料、アルコール飲料、希釈飲料、果肉飲料、牛乳、乳飲料、乳酸菌飲料、乳清飲料、スポーツドリンク、豆乳、機能型ドリンク、ミネラルウォーター、炭酸水などの飲料類、だし、またはデザートベースなどが挙げられ、液体の食品が好ましいがこれらに限定されない。なお、本食品には、甘味料、酸味料、香料、色素、保存料などの成分を必要に応じて適宜添加することができる。

20

【0017】

本発明の化粧品は、石鹸、シャンプー、リンス、化粧水、整髪料、染毛剤、浴用剤、日焼け止め剤、制汗剤などを意味し、化粧品用液体組成物とは、水を主な溶媒とする液体状の化粧品並びに水を主な溶媒とする液体状の組成物であって、上記化粧品の原料となるものを指す。また、上記化粧品と同じ使用目的あるいは同じ使用態様で医薬品もしくは医薬部外品に分類されるものも、本発明における化粧品に包含される。本発明では、上記化粧品用液体組成物に保湿剤、界面活性剤、色素、香料、防腐・殺菌剤、酸化防止剤などを必要に応じて適宜添加することができる。

30

【0018】

本発明の医薬品や酵素、細胞類としては、生理活性を有する各種の薬物、ビリルビン酸オキシダーゼやアルカリホスファターゼ、乳酸脱水素酵素、マレイン酸脱水素酵素、制限酵素などの酵素から成る蛋白質類、大腸菌やプロトプラストなどの細胞類が挙げられ、これらを含む液体組成物には、保湿剤、界面活性剤、色素、香料、防腐・殺菌剤、酸化防止剤などを必要に応じて適宜添加することができる。

【0019】

本発明は、冷凍温度でない温度で、通常は常温で流通可能な液体組成物を、使用前に冷凍し使用する冷凍品であって、変性防止効果を有する不凍蛋白質を含有する冷凍用液体組成物に関する。本発明の冷凍用液体組成物は、化粧品、冷凍菓子などの冷凍食品などが挙げられるが、これに限定されない。本発明の不凍蛋白質を冷凍用液体食品に使用することで、少なくとも液体組成物中の内容成分の比重差による変性防止または／および冷凍による氷結晶成長を抑制するために、液体組成物中の内容成分の沈殿や分離を防止するばかりか、内容成分の分解や不活化などの変性を防止するなど有用な効果を奏する。さらには、冷凍および冷解凍を繰り返し使用しても前記と同様の効果を有する。本発明は、使用前の不凍蛋白質を含む変性防止剤を使用した液体組成物、およびそれを冷凍させた液体組成物の冷凍品、またそれらの中間体にも関する。

40

【0020】

例えば、本発明の液体組成物である食品または冷凍食品は、冷凍でない温度で、通常は常

50

温で流通することができ、喫食前に冷凍する冷凍菓子であって、本発明の不凍蛋白質を含む変性防止剤を使用した冷凍菓子、および喫食前で冷凍処理する前の冷凍用液体食品に関する。例えば、フルーツシャーベット、フローゾンヨーグルト、アイスクリーム類などが挙げられる。

【0021】

従来の冷凍菓子に見られた可溶性糖分をより高濃度に含有する水分の相と低濃度の相とが分別され、さらに該水分の相は時間経過とともに針状結晶を形成する。それに対して、本発明の不凍蛋白質を含む上記の冷凍菓子は、本発明の不凍蛋白質の変性防止効果により氷結晶の成長を阻害することで口解けの良好な食感となる。さらに、常温で流通することができるとともに、従来の常温流通タイプの冷凍菓子と比べて、冷凍すれば即時に食べることができる硬さを有するなど品質が良好で、かつ、常温での保管管理でも、冷凍および冷解凍を繰り返しても、内容物の凝集、沈殿、濁り物質の発生や変色、退色、脂質の劣化を防止するばかりでなく、その食感も変化せず、商品として高価値の冷凍菓子が提供可能である。

【0022】

【実施例】

以下、実施例および試験例を示してこの出願の発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

【実施例1】

10mgの不凍蛋白質(Canada A/F Protein Inc. 社製; Type I)と0.2gの砂糖製カラメル(池田糖化工業株式会社製; 市販品)を100mlの蒸留水に溶かした。50ml蓋付き試験管に30ml充填し、-20℃の業務用冷凍冷蔵庫(三洋電機株式会社製; SRR-MV1883C4)中に20時間静置し、冷凍品を得た。ブランクとして不凍蛋白質を含まないカラメル水、対照としては10mgのBSA(和光純薬株式会社製)を混合したカラメル水を作成した。冷凍品を、静置したまま室温で自然解凍後、評価を行った。

【0023】

(解凍後のカラメル水の評価)

評価は、不凍蛋白質を添加した試料とブランクとして不凍蛋白質を含まない試料、対照として不凍蛋白質の代わりに10mgのBSAを添加したカラメル水を使用して行った。試験は、解凍後のカラメル水の上層20mlをピペットで静かに抜き取り、上層部および下層部の色を吸光度計(日本分光株式会社製; V-560)で測定した(波長500nmにおける吸光度)。

【0024】

その結果、コントロールおよびBSA添加試料では下層部に濃色の濃色部が見られ、吸光度も高い値を示した上、上層部は吸光度の低下が見られたが、不凍蛋白質を添加した試料では色成分の分離が見られず、冷凍前と変わらない均一かつ良好な状態を保ち、吸光度の差もほとんどなかった。

【0025】

【表1】

| | 上層部 | 下層部 |
|-------|-------|-------|
| ブランク | 0.362 | 1.289 |
| 不凍蛋白質 | 0.602 | 0.819 |
| BSA | 0.345 | 1.390 |
| 冷解凍前 | 0.841 | |

【 0 0 2 6 】

【 実施例 2 】

10 mg の不凍蛋白質 (Canada A F Protein Inc. 社製 ; Type I) と 0.145 g の粉末コーヒー (ネスレ日本株式会社製 ; ネスカフェゴールドブレンド) を 100 ml の蒸留水に溶かした。50 ml 蓋付き試験管に 20 ml 充填し、-20℃ の業務用冷凍冷蔵庫 (三洋電機株式会社製 SRR-MV1883C4) 中に 20 時間静置し、冷凍品を得た。ブランクとして不凍蛋白質を含まない試料、対照としては 10 mg の BSA (和光純薬工業株式会社製) を混合した試料、または 10 mg のゼラチン (株 20
式会社ダイエー製ゼラチンパウダー) を混合した試料を作成した。冷凍品を 25℃ 下で 3 時間静置解凍後に評価を行った。

【 0 0 2 7 】

(解凍後のコーヒーの評価)

評価は、上記の 4 種の試料について、冷凍前のコーヒー液をコントロール試料として行った。試験は解凍後のコーヒーを吸引濾過 (アドバンテック株式会社製直径 70 mm、5 C 濾紙を使用) した場合の濾過時間および、濾紙上の澱の観察によって行った。

【 0 0 2 8 】

その結果、不凍蛋白質を添加した試料は底部の色がやや濃くなっていたものの浮遊物が無く、冷凍前のコーヒーと変わりがなかった。未添加試料やゼラチン添加試料の冷解凍品には大きな浮遊物が多数存在した。浮遊物は明確に目視できるもので、微生物の繁殖を連想させ、品質の低下と認識されるものであった。振とうや攪拌によっても再び溶解せず冷凍前のコーヒーには復元しなかった。濾紙による濾過試験においては、浮遊物が生じたものは微細な粒子が濾紙を目詰まりさせないため濾過時間が短かった。また、これら浮遊しその後沈殿した物質は強い苦みを感じさせたので、冷解凍がコーヒーの味を不均一化し、苦みの局在化を引き起こし、総合的な味質を悪化させたことが分かった。以上の結果より、本発明が濁りや沈殿の発生を含む品質の悪化を防止するのに効果的であることが分かる。

【 0 0 2 9 】

【 実施例 3 】

16 g の茶葉 (静岡産煎茶) を 200 ml の沸騰水に入れ、80℃ で 5 分間抽出後、ただちに氷冷して 30℃ 以下に冷却した。これを濾布ろ過して緑茶抽出液を得た (92 ml)。2 mg の不凍蛋白質 (Canada A / F Protein Inc. 社製 ; Type I) を 20 ml の上記緑茶抽出液に添加混合した。50 ml 容量の蓋付き試験管に充填し、-20℃ の業務用冷凍冷蔵庫 (三洋電機株式会社製 SRR-MV1883C4) 中に 20 時間静置し、冷凍品を得た。ブランクとして不凍蛋白質を含まない緑茶抽出液、対照としては 2 mg の BSA (和光純薬工業株式会社製) を混合した緑茶抽出液、または 2 mg のゼラチン (株式会社ダイエー製) を混合した緑茶抽出液を作成した。冷凍品を、静置したまま室温で自然解凍後、評価を行った。

【 0 0 3 0 】

20

30

40

50

(解凍後の緑茶抽出液の評価)

評価は、不凍蛋白質を添加した試料、およびブランクとして不凍タンパク質を含まない試料、対照としてBSA添加試料、ゼラチン添加試料を使用して行った。冷解凍後の緑茶抽出液の上層15mlをピペットで静かに抜き取り、上層部および下層部の波長600nmにおける吸光度をプレートリーダー（日本モレキュラーデバイス株式会社製 SPECTRAMAX PLUS）で測定した。その結果、ブランクおよびBSA添加試料、ゼラチン添加試料では下層部に澱の濃色部が見られ吸光度も高い値を示しており、上層部は逆に希薄溶液となっていた。一方、不凍蛋白質を添加した試料は冷解凍後も澱の生成が少なく冷凍前とほぼ変わらない色調であった。

【 0 0 3 1 】

10

【 表 2 】

| | 上層部 | 下層部 |
|-------|-------|-------|
| ブランク | 0.313 | 1.694 |
| 不凍蛋白質 | 0.568 | 0.982 |
| BSA | 0.317 | 1.592 |
| ゼラチン | 0.389 | 1.856 |

【 0 0 3 2 】

【 発明の効果 】

本発明によれば、変性防止効果を有する不凍蛋白質を含む、例えば飲料や液体化粧品、液体医薬品、液体酵素溶液などの液体組成物が提供される。これらの飲料や化粧品、薬品類は、不凍蛋白質により有用成分の不活化や濁り物質、沈殿物質の生成、退色を含む変色などが抑制され、製品の視覚的外観を害することなく、清澄な外観を呈することが可能となる。加えて酵素や細胞においても、それらの変性である不活性化を免れることができる。また本発明の実施例において、冷凍および冷解凍を繰り返し行ったのは、常温での濁り物質、沈殿物質の発生を、加速度的に行うための加速度試験である。また、これらのことから、本発明の不凍蛋白質を使用することで、繰り返し行った冷凍時においても濁り物質の発生や、有用成分の不活性化を防止し、内容成分の比重差による沈殿の防止、および氷結晶の成長抑制などの効果を奏する。さらに、本発明の不凍蛋白質を使用した液体組成物に関しては、液体組成物中の内容成分の分離や濃度の偏りを防止するばかりか、脂質などの酸化を含む変性を防止し、内容成分の分解などの変性を防止するなど有用な効果を奏する。

30

【 0 0 3 3 】

よって、本発明の不凍蛋白質を使用した液体組成物は、常温条件、冷蔵条件だけでなく、冷凍および冷解凍を繰り返すような条件においても、変性である濁り、沈殿現象などを生じず、製造直後と同等の品質の製品が提供可能である。

フロントページの続き

| | | |
|----------------------------|---------------|-------------|
| (51) Int. Cl. ⁷ | F I | テーマコード (参考) |
| A 6 1 K 7/00 | A 6 1 K 7/00 | 4 C 0 8 3 |
| A 6 1 K 9/08 | A 6 1 K 9/08 | |
| A 6 1 K 47/42 | A 6 1 K 47/42 | |
| // A 2 3 F 3/16 | A 2 3 L 2/00 | K |
| A 2 3 F 5/24 | A 2 3 F 3/16 | |
| | A 2 3 F 5/24 | |

Fターム(参考) 4B017 LC01 LC02 LC03 LC07 LE10 LG14 LK15 LL09 LP14
 4B018 LB08 LE05 MC04 MD14 MD20 ME13 MF02 MF05
 4B022 LA01 LA04 LA08 LB01 LJ04
 4B027 FB01 FB21 FC01 FC10 FE06 FK05 FP80 FQ16
 4C076 AA12 BB01 EE41Q FF11 FF36
 4C083 AD411 CC01 CC02 CC31 DD23 DD27 EE01 EE10

PATENT COOPERATION TREATY

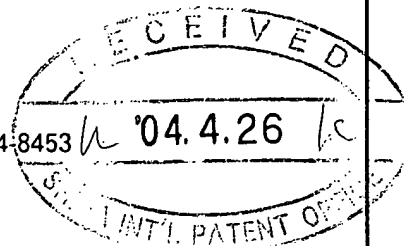
PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHIGA, Masatake
2-3-1, Yaesu
Chuo-ku, Tokyo 104-8453
Japan

| | |
|---|---|
| Date of mailing (day/month/year) 14 April 2004 (14.04.2004) | |
| Applicant's or agent's file reference PC-9028 | IMPORTANT NOTIFICATION |
| International application No. PCT/JP2003/017020 | International filing date (day/month/year) 26 December 2003 (26.12.2003) |
| International publication date (day/month/year) Not yet published | Priority date (day/month/year) 20 March 2003 (20.03.2003) |
| Applicant NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY et al | |

- By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- (If applicable) An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document **submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b)** (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

| <u>Priority date</u> | <u>Priority application No.</u> | <u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u> | <u>Date of receipt of priority document</u> |
|---------------------------|---------------------------------|---|---|
| 20 Marc 2003 (20.03.2003) | 2003-78977 | JP | 19 Febr 2004 (19.02.2004) |

| | |
|--|---|
| The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 338.90.90 | Authorized officer Florliza DAYAO (Fax 338 9090) Telephone No. (41-22) 338 8986 |
|--|---|

予備審査請求は専ら国際予備審査機関へ直接行わなければならない。2以上の管轄機関がある場合には、出願人の選択による。

IPEA/JP

特許協力条約に基づく国際出願 国際予備審査請求書

第 II 章

出願人は、次の国際出願が特許協力条約に従って国際予備審査の対象とされることを請求する。



国際予備審査機関記入欄

国際予備審査機関の確認

請求書の受理の日

第 I 欄 国際出願の表示

出願人又は代理人の登録記号

PC-9028

国際出願番号

PCT/JP03/17020

国際出願日 (日, 月, 年)

26.12.03

優先日 (最先のもの) (日, 月, 年)

20.03.03

発明の名称

含水物中における物質の凍結濃縮を抑制する方法、生理活性物質の失活を抑制する方法、および成分が均質に拡散した凍結物又は凍結乾燥物を製造する方法

第 II 欄 出願人

氏名 (名称) 及びあて名: (姓, 名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

独立行政法人 産業技術総合研究所
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
〒100-8921 日本国東京都千代田区霞が関一丁目3番1号
3-1, Kasumigaseki 1-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8921 Japan

電話番号:

ファクシミリ番号:

加入電信番号:

出願人登録番号:

国籍 (国名): 日本国 JAPAN

住所 (国名): 日本国 JAPAN

氏名 (名称) 及びあて名: (姓, 名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

株式会社ニチレイ
NICHIREI CORPORATION
〒104-8402 日本国東京都中央区築地六丁目19番20号
19-20, Tsukiji 6-chome, Chuo-ku, Tokyo 104-8402 Japan

国籍 (国名): 日本国 JAPAN

住所 (国名): 日本国 JAPAN

氏名 (名称) 及びあて名: (姓, 名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

津田 栄
TSUDA Sakae
〒062-8517 日本国北海道札幌市豊平区月寒東2条17丁目2-1
独立行政法人産業技術総合研究所 北海道センター内
c/o National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Hokkaido Center,
2-17-2-1, Tsukisamu-Higashi, Toyohira-ku, Sapporo-shi, Hokkaido 062-8517 Japan

国籍 (国名): 日本国 JAPAN

住所 (国名): 日本国 JAPAN



その他の出願人が続葉に記載されている。

様式 PCT/IPEA/401 (第1用紙) (2004年1月版)

予備審査請求書の備考参照

第 II 欄の続き 出願人

この第 II 欄の続きを使用しないときは、この用紙を国際予備審査請求書に含めないこと。

氏名 (名称) 及びあて名: (姓、名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

三浦 愛

MIURA Ai

〒062-8517 日本国北海道札幌市豊平区月寒東2条17丁目2-1

独立行政法人産業技術総合研究所 北海道センター内

c/o National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Hokkaido Center,
2-17-2-1, Tsukisamu-Higashi, Toyohira-ku, Sapporo-shi, Hokkaido 062-8517 Japan

国籍 (国名): 日本国 JAPAN

住所 (国名): 日本国 JAPAN

氏名 (名称) 及びあて名: (姓、名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

平山 泰

HIRAYAMA Yasushi

〒261-8545 日本国千葉県千葉市美浜区新港9

株式会社ニチレイ 食品安全センター

c/o NICHIREI CORPORATION, Food Safety Research Center, 9 Shinminato, Mihama-ku,
Chiba-shi, Chiba 261-8545 Japan

国籍 (国名): 日本国 JAPAN

住所 (国名): 日本国 JAPAN

氏名 (名称) 及びあて名: (姓、名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

井上 敏文

INOUE Toshifumi

〒261-8545 日本国千葉県千葉市美浜区新港9

株式会社ニチレイ 研究開発センター内

c/o NICHIREI CORPORATION, RESEARCH & DEVELOPMENT DIVISION, 9 Shinminato,
Mihama-ku, Chiba-shi, Chiba 261-8545 Japan

国籍 (国名): 日本国 JAPAN

住所 (国名): 日本国 JAPAN

氏名 (名称) 及びあて名: (姓、名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

北河 章宏

KITAGAWA Akihiro

〒104-8402 日本国東京都中央区築地六丁目19番20号

株式会社ニチレイ 商品部内

c/o NICHIREI CORPORATION, Products Management Division, 19-20, Tsukiji 6-chome,
Chuo-ku, Tokyo 104-8402 Japan

国籍 (国名): 日本国 JAPAN

住所 (国名): 日本国 JAPAN



その他の出願人が他の続葉に記載されている。

第Ⅲ欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

下記に記載された者は、☒ 代理人 又は ☐ 共通の代表者 として

- ☒ 既に選任された者であって、国際予備審査についても出願人を代理する者である。
- ☐ 今回新たに選任された者である。先に選任されていた代理人又は共通の代表者は解任された。
- ☐ 既に選任された代理人又は共通の代表者に加えて、特に国際予備審査機関に対する手続きのために、今回新たに選任された者である。

氏名（名称）及びあて名：（姓、名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

6490 弁理士 志賀 正武 SHIGA Masatake
8903 弁理士 渡邊 隆 WATANABE Takashi
〒104-8453 日本国東京都中央区八重洲2丁目3番1号
2-3-1, Yaesu, Chuo-ku, Tokyo 104-8453 Japan

電話番号：

03-5288-5811

ファクシミリ番号：

03-5288-5831

加入電信番号：

代理人登録番号：

- ☐ 通知のためのあて名：
代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す。

第Ⅳ欄 国際予備審査に対する基本事項

補正に関する記述：*

1. 出願人は、次のものを基礎として国際予備審査を開始することを希望する。

- ☐ 出願時の国際出願を基礎とすること。
- ☐ 明細書に関して ☐ 出願時のものを基礎とすること。
☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。
- ☐ 請求の範囲に関して ☐ 出願時のものを基礎とすること。
☐ 特許協力条約第19条の規定に基づいてなされた補正（添付した説明書も含む）を基礎とすること。
☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。
- ☐ 図面に関して ☐ 出願時のものを基礎とすること。
☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

2. ☐ 出願人は、特許協力条約第19条の規定に基づく請求の範囲について行った補正を無視し、かつ、取り消されたものとみなして開始することを希望する。
3. ☐ 出願人が国際予備審査の開始を規則69.1(d)に基づき適用される期間の満了まで延期することを希望する。
4. ☐ 出願人が国際予備審査を規則54の2.1(a)に基づき適用される期間の満了よりも早く開始することを明示的に希望する。

*記入がない場合は、1)補正がないか又は国際予備審査機関が補正（原本又は写し）を受領していないときは、出願時の国際出願を基礎に予備審査が開始され、
2)国際予備審査機関が、見解書又は予備審査報告書の作成開始前に補正（原本又は写し）を受領したときは、これらの補正を考慮して予備審査が開始又は続行される。

国際予備審査を行うための言語は、日本語であり、

- ☒ 国際出願の提出時の言語である。
- ☐ 国際調査のために提出した翻訳文の言語である。
- ☐ 国際出願の公開の言語である。
- ☐ 国際予備審査の目的のために提出した翻訳文の言語である。

第Ⅴ欄 国の選択

この様式を用いてされた国際予備審査の請求は、指定され、かつPCT第Ⅱ章に拘束される全ての締約国を選択する国際予備審査の請求となる。

第Ⅵ欄 照合欄

この国際予備審査請求書には、国際予備審査のために、第Ⅳ欄に記載する官語による下記の書類が添付されている。

1. 国際出願の翻訳文..... : 枚
2. 特許協力条約第34条の規定に基づく補正書..... : 枚
3. 特許協力条約第19条の規定に基づく補正書
(又は、要求された場合は翻訳文)の写し..... : 枚
4. 特許協力条約第19条の規定に基づく説明書
(又は、要求された場合は翻訳文)の写し..... : 枚
5. 書簡..... : 枚
6. その他(書類名を具体的に記載) : 枚

国際予備審査機関
記入欄

受 領 未 受 領

| | |
|--------------------------|--------------------------|
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

この国際予備審査請求書には、さらに下記の書類が添付されている。

1. ☒ 手数料計算用紙
2. ☒ 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面
3. ☒ 国際事務局の口座へ振込を証明する書面
4. ☐ 個別の委任状の原本
5. ☐ 包括委任状の原本
6. ☐ 包括委任状の写し(あれば包括委任状番号) :
7. ☐ 記名押印(署名)の欠落についての説明書
8. ☐ コンピュータ読み取り可能な形式による配列表
9. ☐ コンピュータ読み取り可能な形式による配列表に関連するテーブル
10. ☐ その他(書類名を具体的に記載) :

第Ⅶ欄 出願人、代理人又は共通の代表者の記名押印

各人の氏名(名称)を記載し、その次に押印する。

志賀 正武



渡邊 隆



国際予備審査機関記入欄

1. 国際予備審査請求書の実際の受理の日

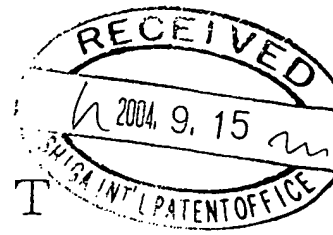
2. 規則 60.1(b)の規定による国際予備審査請求書の受理の日の訂正後の日付

3. ☐ 優先日から19月を経過後の国際予備審査請求書の受理。
ただし、以下の4,5の項目にはあてはまらない。
☐ 出願人に通知した。
4. ☐ 規則80.5により延長が認められている優先日から19月の期間内の国際予備審査請求書の受理
5. ☐ 優先日から19月を経過後の国際予備審査請求書の受理であるが規則82により認められる。
6. ☐ 規則 54 の 2.1(a)の期限の経過後の国際予備審査請求書の受理。
ただし、以下の7,8の項目にはあてはまらない。
7. ☐ 規則 80.5 により延長が認められている規則 54 の 2.1(a)の期限内の国際予備審査請求書の受理。
8. ☐ 規則 54 の 2.1(a)の期間の経過後の国際予備審査請求書の受理であるが規則 82 により認められる。

国際事務局記入欄

国際予備審査請求書の国際予備審査機関からの受領の日:

特許協力条約



発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

志賀 正武

殿

あて名

〒104-0028

東京都中央区八重洲2丁目3番1号 志賀国際特許事務所

P C T

国際予備審査請求書の受理通知書

（法施行規則第54条第1項）

〔PCT規則59.3(e)及び61.1(b)第1文、実施細則601(a)〕

PCT/JP03/17020

PE402

発送日（日、月、年）

14.09.04

出願人又は代理人
の書類記号

PC-9028

重 要 な 通 知

国際出願番号

PCT/JP03/17020

国際出願日（日、月、年）

26.12.03

優先日（日、月、年）

20.03.03

出願人（氏名又は名称）

独立行政法人 産業技術総合研究所

1. 国際予備審査機関は、国際出願の国際予備審査請求書を次の日に受理したことを通知する。

31日08月04年

2. この受理の日は次に示す日である。



管轄する国際予備審査機関が国際予備審査請求書を受理した日
（PCT規則61.1(b)）



管轄する国際予備審査機関に代わって国際予備審査請求書を受理した日
（PCT規則59.3(e)）



国際予備審査請求書の手続き補完書を管轄する国際予備審査機関が受理した日

3. ☐ （注意）受理の日は、優先日から19月が経過している。

したがって、官庁によっては国際予備審査請求が国内段階移行時期を優先日から30月（これより遅い期限を規定する官庁もある）までに延長する効果はなく（PCT第39条（1））、国内段階移行の手続きは、優先日から20月（これより遅い期限を規定する官庁もある）以内に行われなければならない。

しかし、官庁によっては、国際予備審査請求の有無に関わらず30月（これより遅い期限を規定する官庁もある）の期限が適用される場合がある。

様式PCT/IB/301の付属書類を参照すること。

適用される期限の詳細については、PCT出願人の手引、第II巻、国内段階およびWIPOインターネットサイトを参照すること。



（該当する場合）この通知は、電話、FAX又は口頭により次の日に行った連絡を確認するためのものである。

4. 上記の3に該当する場合に限り、この通知書の写しを国際事務局に送付した。

名称及びあて名

日本国特許庁（IPEA/JP）

郵便番号 100-8915 TEL03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/IPEA/402（2002年4月）

権限のある職員

特許庁長官